

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640042

研究課題名(和文) 鼻粘膜に存在する認知症バイオマーカーの同定と鼻粘膜を用いた低侵襲的診断法の開発

研究課題名(英文) Determinations of nasal biomarkers for dementia and development of a novel diagnostic method for Alzheimer's disease using nasal samples.

研究代表者

遠山 育夫 (Tooyama, Ikuo)

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・教授

研究者番号：20207533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)の早期診断法として、PETによるアミロイドイメージングや髄液中のアミロイドペプチド(A_β)の測定が提唱されているが、もっと簡便で侵襲が少なく安価な診断法の開発が期待されている。我々は、血液を介さずに脳内との間で物質の移動が行われる鼻腔・鼻粘膜に着目し、鼻粘膜に存在する認知症バイオマーカーの同定と測定技術の確立を目的に本研究を行った。その結果、ヒト鼻粘膜中にA_β、タウ、リン酸化タウが存在することを明らかにした。さらに、ヒト鼻粘膜サンプルをからA_β42を定量測定する方法を開発して学術誌に発表した。開発した方法を用いてAD患者、対照例を対象に臨床研究を実施した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the nasal mucosa of postmortem human samples, and found that β -amyloid peptides (A_β), tau protein and phosphorylated tau protein were localized in human nasal mucosa. We could measure contents of total tau and phosphorylated tau proteins in human nasal smears using commercial ELISA kits. But, it is difficult to measure A_β content in human nasal smears. In this study, we developed a novel and sensitive method of measuring A_β42 in the human nasal cavity and its application in normal human volunteers. We collected nasal smears by cotton swab from the mucosa of the inferior nasal concha and common nasal meatus of 26 normal volunteers with an age range of 23-78 years. Our novel enabled us to measure A_β42 content in both the inferior nasal concha and the common nasal meatus of all cases examined, despite the levels being under detection limits (0.1 pmol/L) without our methods.

研究分野：神経科学

キーワード：脳神経疾患 アルツハイマー病 認知症 診断 鼻粘膜

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病の早期診断技術として、PET によるアミロイドイメージングや髄液中のβアミロイドペプチド (Aβ) の測定が提唱されているが、もっと簡便で侵襲が少なく安価な診断法の開発が期待されている。我々は、血液を介さずに脳内との間で物質の移動が行われる鼻腔・鼻粘膜に着目し、アルツハイマー病遺伝子改変モデルマウスを用いて検討したところ、鼻粘膜の Aβ42 沈着量が脳内の Aβ42 沈着量と正比例することを発見した (Neuroscience Letters, 2012)。しかし、鼻粘膜には Aβ に限らず、認知症の神経病理を反映する様々な病態関連因子が集積していると考えられる。そこで、鼻粘膜中に存在する認知症バイオマーカーを同定し、それを測定することで、アルツハイマー病 (Alzheimer's Disease, AD) をはじめとする認知症の体外診断を行うことを考えた。脳の生検はできないが鼻粘膜採取はほとんど侵襲なく行える。鼻粘膜に存在するバイオマーカーを同定し、その定量化が可能になれば、低侵襲で安価な認知症診断が可能になると期待され、学術的のみならず社会的にも医療経済学的にも貢献できると考える。

2. 研究の目的

本研究では、認知症の病態に深く関連し鑑別診断に必須な Aβ、リン酸化タウ蛋白をはじめとする認知症バイオマーカーについて、
 1) ヒト鼻粘膜での存在を病理学のおよび質量分析装置で明らかにする。
 2) ヒト鼻粘膜試料を用いた定量測定法の開発を行う。
 ことを目的とする。

3. 研究の方法

倫理委員会の承認のもと、認知症の病態に深く関連し鑑別診断に必須な Aβ、リン酸化タウ蛋白をはじめとする認知症バイオマーカーについて、以下の計画を実施した。

1) ヒト剖検試料を用いた検討

本研究は、分担研究者の赤津裕康客員准教授の本務先である福祉村病院ブレインバンクと共同で行った。患者さんあるいはご家族から書面での承諾を得た患者さんの剖検時に、脳および鼻粘膜を摘出した。一部は固定し、一部は冷凍保存を行う。固定標本は、病理学的検索を行うとともに Aβ、リン酸化タウ、タウ蛋白について免疫組織化学法を用いてその存在と局在を検証した。凍結標本は、Western blots 法に供し、Aβ、リン酸化タウ、タウ蛋白抗体で解析した (担当 遠山、赤津)。一部の組織は、質量分析装置での解析を行った (担当 井之上)。

2) ヒト生体試料の鼻粘膜サンプルを用いた検討

倫理委員会の承認の上で、滋賀医科大学附属病院神経センター認知症外来において、認知症患者さんおよび対照ボランティアから、

十分なインフォームドコンセントを行い書面にて承諾を得る (担当 遠山)。附属病院耳鼻咽喉科外来にて承諾を得た方から鼻粘膜試料を採取した (担当 清水)。鼻粘膜試料中に含まれる Aβ42、リン酸化タウ、総タウ蛋白の定量を行った (担当 遠山)。

臨床研究の実施にあたっては、本学の臨床研究開発センターの協力を得て、その指導のもとに実施した。

4. 研究成果

Aβ42 とタウ蛋白について検討した。ヒトの鼻腔サンプルからベータアミロイドペプチドと総蛋白を定量する方法を開発した。この方法を用いると従来法ではヒトの鼻腔サンプルから全く検出できなかった Aβ を定量出来た (Figure 1)。その成果の一部を論文発表した (Journal of Brain Science, 2014)。

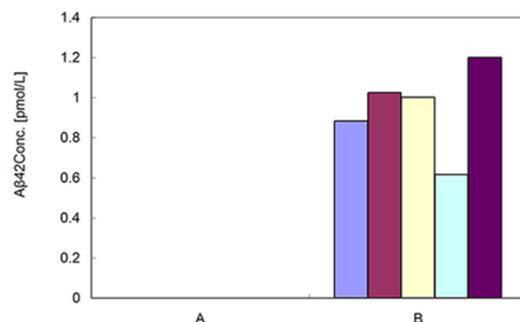


Figure 1. Aβ42 levels in nasal smears from five normal subjects. Nasal swab samples from the common nasal meatus were treated by two different methods. A; Samples diluted with the diluent from the ELISA kit (no pretreatment). B; Samples pretreated with formic acid and prepared by our method.

本測定法による Aβ42 の検定曲線は、濃度が 0.5 to 10 pmol/L の範囲で直線的で、correlation coefficient (R)値は、0.9984 以上であり、正確度は、lower limit of quantification (LLOQ)である 0.5 pmol/L で-3.7%-13.1%、その他の濃度で-9.5%-13.2%であった (Table 1)。この値は、ICH ガイドラインが定める correlation coefficient (R)値が 0.99000 以上、正確度が、LLOQ で ± 20% 以内、その他の値で ± 15% 以内という基準を満たしている。

Sample name	Concentration added (pmol/L)	1		2		3	
		Regression value (pmol/L)	Accuracy (%)	Regression value (pmol/L)	Accuracy (%)	Regression value (pmol/L)	Accuracy (%)
STD-1	0.50	0.57	13.13	0.56	12.43	0.48	-3.70
STD-2	1.00	0.90	-9.54	1.05	4.71	1.13	13.24
STD-3	2.00	2.12	5.88	2.15	7.28	2.01	0.62
STD-4	5.00	4.85	-3.10	5.25	4.99	5.24	4.71
STD-5	8.00	7.96	-0.56	8.33	4.11	8.28	3.50
STD-6	10.00	10.60	6.03	10.27	2.74	10.36	3.60

Abbreviation: STD, standard.

Table 1. Calibration curve for the measurement

of β -amyloid 42 using our novel pretreatment method.

本方法の特異性については、blank sample の値が、LLOQ の値よりも低く、sample for specificity (SP-L)の値が、-4.5%であった (Table 2)。これも ICH ガイドラインが定める基準を満たしていた。

Sample name	Concentration added (pmol/L)	Measurement value	Quantitative value (pmol/L)	Accuracy (%)
Blank	0	0.0388		
LLOQ	0.5	0.0720		
SP-L	1.0	0.1070	0.95	-4.53

Abbreviations: LLOQ, lower limit of quantification; SP-L, sample for specificity.

Table 2. Specificity of β -amyloid 42 measurement using our novel pretreatment method.

再現性については、QC samples における accuracy rate と precision rate は、それぞれ -8.4%-15.9%と 6.4%-16.5%であり、いずれも ICH ガイドラインが定める基準を満たしていた。

Sample name	Concentration added (pmol/L)	Quantitative value (pmol/L)	S.D.	Precision (%)	Accuracy (%)
QC-L	1.00	1.16	0.07	6.42	15.85
QC-M	5.00	4.99	0.82	16.46	-0.12
QC-H	8.00	7.32	0.61	8.30	-8.44

Abbreviations: QC-L, quality control (low); QC-M, quality control (medium); QC-H, quality control (high); S.D., standard deviation.

Table 3. Within-run reproducibility of $A\beta$ 42 measurement using our novel pretreatment method (n=4)

測定法が ICH ガイドラインの基準を満たし、使用できることがわかった。そこで、倫理委員会の承認を得て、この方法を用いて、26名の正常ボランティア (23-78歳、男性13名、女性13名)の下鼻甲介および総鼻道の $A\beta$ 42 の値を測定した (Figure 2)。その結果、下鼻甲介の $A\beta$ 42 の値は、総鼻道の $A\beta$ 42 の値よりも有意に高値であった ($p < 0.01$)。この結果は、脳に近い領域の方が、 $A\beta$ 42 の値が高い可能性を示唆している。

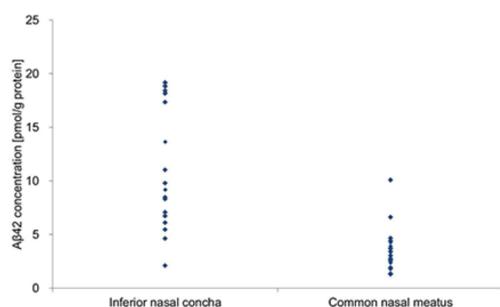


Figure 2. Amount of β -amyloid 42 ($A\beta$ 42) per gram of total protein in samples from the inferior nasal concha and common nasal meatus of 21

volunteers. $A\beta$ 42 levels in the inferior nasal concha and common nasal meatus were measured following our described pretreatment method. The final $A\beta$ 42 concentrations in the inferior nasal concha were significantly different to the common nasal meatus (Wilcoxon signed rank test; $P < 0.001$).

また、福祉村病院ブレインバンクから供与を受けた共同で行ったヒト剖検サンプルにおける検討では、鼻粘膜に $A\beta$ 42 とリン酸化タウ蛋白が沈着していることを免疫組織化学的に明らかにした。特に、リン酸化タウ蛋白では、アルツハイマー病例の鼻腔で強く染色された。

さらに、倫理委員会の承認のもと開発した方法を用いて AD 患者 25 例、対照例 25 例を対象に、鼻サンプル中の $A\beta$ 42、総タウ蛋白、リン酸化タウ蛋白、総蛋白を測定する臨床研究を実施した。患者登録、サンプル採取、測定については、2016 年 3 月 31 日にすべて終了し、現在、測定結果を解析中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Nanjo T, Fukuhara T, Kameshima N, Yanagisawa D, Shimizu S, Shimizu T, Shiino A, Akatsu H, Yamamoto T, Tooyama I: Development of a method to measure $A\beta$ 42 in nasal cavity samples and its application in normal human volunteers. *J Brain Science* 44 : 5-23, 2014、査読有り

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 1 件)

- ① Tooyama I, Ibrahim NF, Durani LW, Hamezah HS, Damanhuri MHA, Wan Ngah WZ, Taguchi H, Yanagisawa D: Curcumin against amyloid pathology in mental health and brain composition. in: Health Fruits, Vegetables, and Herbs: Bioactive Foods in Promoting. Elsevier, 2016 (In press)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
http://www.shiga-med.ac.jp/~hqmnran/gallery_128.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠山 育夫 (Tooyama Ikuo)
滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・教授
研究者番号：20207533

(2) 研究分担者

赤津 裕康 (Akatsu Hiroyasu)
名古屋市立大学医学研究科・特任教授
研究者番号：00399734

井之上 浩一 (Inoue Koichi)
立命館大学・薬学部・准教授
研究者番号：30339519

清水 志乃 (Shimizu Shino)
滋賀医科大学・医学部・医員
研究者番号：50505592

(3) 連携研究者

道川 誠 (Michikawa Makoto)
名古屋市立大学・医学部・教授
研究者番号：40270912

松川 則之 (Matsukawa Noriyuki)
名古屋市立大学・医学部・教授
研究者番号：20305543